



TITLE:

Development of a high-frequency in vivo transposon mutagenesis system for cyanobacteria and establishment of the forward genetic analysis of the Chl d-dominated cyanobacterium, *Acaryochloris marina* by use of the system( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Watabe, Kazuyuki

---

CITATION:

Watabe, Kazuyuki. Development of a high-frequency in vivo transposon mutagenesis system for cyanobacteria and establishment of the forward genetic analysis of the Chl d-dominated cyanobacterium, *Acaryochloris marina* by use of the system. 京都大学, 2 ...

ISSUE DATE:

2015-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19069>

RIGHT:

許諾条件により本文は2016/03/22に公開

( 続紙 1 )

京都大学	博士（ 人間・環境学 ）	氏名	渡部 和幸
論文題目	Development of a high-frequency <i>in vivo</i> transposon mutagenesis system for cyanobacteria and establishment of the forward genetic analysis of the Chl <i>d</i> -dominated cyanobacterium, <i>Acaryochloris marina</i> by use of the system （シアノバクテリアにおける高頻度な <i>in vivo</i> のトランスポゾンタギング系の開発およびその系を利用したChl <i>d</i> を利用するシアノバクテリア、 <i>Acaryochloris marina</i> における順遺伝学的解析の確立）		
(論文内容の要旨)			
<p>本学位申請論文は、酸素発生型光合成生物であるシアノバクテリアの研究を推進するための技術を開発しようとしたものである。シアノバクテリアを研究対象として、分子遺伝学的な解析を行うための実験系を開発することが本論文の目的である。</p> <p>本論文は4章から構成される。第1章では、シアノバクテリアの多様性について概説し、さまざまなシアノバクテリアを対象として分子遺伝学的に解析する意義について論じている。これまでに解析が進んでいるモデルシアノバクテリアでは、標的遺伝子の破壊による逆遺伝学的解析が主に行われてきた。しかし、機能が未知な遺伝子も数多く残されており、形質の変化から原因遺伝子を特定する順遺伝学的解析の必要性が増してきている。一方、特殊な性質を示すシアノバクテリアでは、分子遺伝学的解析に必要な実験系が確立されていないものが多い。そこで、トランスポズンを遺伝子内に転移させて、その挿入により突然変異体を作製したり、トランスポズンを指標として変異体の原因遺伝子を同定する、トランスポゾンタギングが有用であると述べている。申請者は、多様なシアノバクテリアに対して順遺伝学的解析を進めるためには既存の系では不十分で、簡便で汎用性が高いトランスポゾンタギング系が必要であることを課題として論じている。</p> <p>第2章では、モデルシアノバクテリアである<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803を対象として高転移頻度のトランスポゾンタギング系の開発に成功したことを記述している。他のシアノバクテリアも含めて、これまでの報告では、作製した変異体でのトランスポズンの再転移の問題が指摘されていた。しかし、本研究で作製したベクターを利用すると、変異体内にトランスポゼースが残らないため、ゲノムDNAに挿入されたトランスポズンの再転移は起きないことが示唆された。トランスポゾンタギングによって得られた変異体から10クローンを選抜しトランスポズンの挿入位置を同定した結果、トランスポズンはそれぞれの変異体についてゲノム中の全く別の部位に挿入されていることが判明した。解析した中で成長が著しく遅い変異体について、トランスポズンで分断されている遺伝子を、プラスミドをもちいて当該変異体に導入したところ、変異体の成長が野生型と同程度まで回復した。これより、トランスポゾンタギングによる変異体の作製から、原因遺伝子候補の導入による機能相補までの一連の順遺伝学的解析の系が確立された。</p>			

さらに、もう一つのモデルシアノバクテリアである *Synechococcus elongatus* PCC 7942 に系を適用した場合でも、高い頻度で変異体を得られることが示された。トランスポゾンの転移頻度は既存の系と比較して約100倍高かった。これらの結果より、*Synechocystis* および *Synechococcus* での高転移頻度のトランスポゾンタギング系が確立されたと言える。

第3章では、クロロフィル *d* を利用することで遠赤色光をもちいて光合成が可能な *Acaryochloris marina* でのトランスポゾンタギング系を開発したことを記述している。第2章で作製したベクターを適用することで、ゲノム中にトランスポゾンが挿入された *A. marina* の変異体を得ることに成功した。得られた変異体におけるトランスポゾンの挿入位置を同定した結果、*Synechocystis* での場合と同様に、それぞれの変異体についてゲノム中の異なる位置にトランスポゾンが挿入されていることが判明した。変異体の作製をさらに続けたところ、黄色を呈する変異体 (Y1変異体) が単離された。トランスポゾンの挿入位置より、モリブデン補因子生合成に関与する酵素である MoaA をコードする遺伝子が Y1 変異体の原因遺伝子と考えられた。そこで、*moaA* 遺伝子を Y1 変異体に導入したところ、細胞は緑色を呈するようになった。モリブデン補因子は硝酸還元酵素に含まれることから、Y1 変異体は窒素源として硝酸イオンを利用できない可能性が考えられた。そこで、硝酸ナトリウムの代わりに塩化アンモニウムを窒素源にした培地で培養したところ、Y1 変異体は黄色くならず緑色を呈するようになった。これらの結果より、Y1 変異体はトランスポゾンの挿入により *moaA* 遺伝子が破壊され、モリブデン補因子の合成が阻害された結果、硝酸還元酵素の活性が著しく低下して、培地の主な窒素源である硝酸イオンを利用できなくなり、窒素欠乏のときと同様に黄色を呈したと考えられた。以上の結果は、*A. marina* での初めての順遺伝学的解析の成果と言える。

第4章では、開発したトランスポゾンタギング系の有用性を整理し、今後のシアノバクテリアの順遺伝学的研究を展望した。このトランスポゾンタギング系は、モデル生物として利用されるシアノバクテリアについては、機能の知られていない遺伝子の機能解明が大いに促進されることが期待された。さらに、遠赤色光でも光合成が可能な *A. marina* に関しては、クロロフィル *d* 合成酵素遺伝子など、遠赤色光に適応するために必要な遺伝子の同定に力を発揮すると考えられた。また、シアノバクテリアのみならず、他のバクテリアへの本系の適用も期待されると結んでいる。

(論文審査の結果の要旨)

現在、人類は食料問題やエネルギー問題などのさまざまな問題に直面している。光合成は、光エネルギーを生物が利用可能な形に変換する反応で、多くの生物が生きるために必要なエネルギー物質の生産に寄与している。それゆえ、光合成の研究は、上記の問題の解決に向けて必要であると考えられている。シアノバクテリアは、植物と同様の光合成を行うため、植物のモデルとして研究されてきた。そして、さまざまな研究手法の中で、近年では順遺伝学的解析の重要度が増してきている。

本研究で、シアノバクテリアを対象として順遺伝学的解析を進めるために、高転移頻度のトランスポゾンタギング系の開発を目指したことは妥当である。トランスポゾンタギングは、複数本の染色体をもつことが多いシアノバクテリアにおいて変異した染色体の維持に適しているが、既存の系では不十分な点があると考えられるからである。

第1章では、シアノバクテリアの多様性および光合成について紹介され、ゲノム情報が比較的容易に得られるようになった現在の光合成研究の状況と問題点が適切に述べられている。さらに、モデル生物として重点的に解析が進められているシアノバクテリアの研究における問題点、解析は進んでいないがクロロフィル $d$ を合成するシアノバクテリアが植物には利用できない遠赤色光で光合成が可能であることなど、両者を研究対象とすることの重要性にも言及し、本論文の研究内容についての目的と意義を提示している。

第2章の*Synechocystis* sp. PCC 6803での高転移頻度のトランスポゾンタギング系の開発では、既報の方法よりもトランスポゾンの転移頻度が約100倍高い実験系を確立している。実験系の開発においては、トランスポゼースへの点変異の導入とトランスポゼースが認識する配列の最適化という既報で行われている改変も施しているが、トランスポゼースへのプロモーターおよびターミネーターの付加、トランスポゾン内に存在する主要な制限酵素部位の除去など、多くの工夫も加えている。さらに、保持型の発現ベクターをもちいた原因遺伝子候補の変異体への導入による機能相補実験により、原因遺伝子を同定する系も確立した。高頻度で変異体を得られることと併せて考えると、これら一連の実験系の確立は、大量の変異体の作製および変異体の原因遺伝子の迅速な同定を可能にしており高く評価できる。また、トランスポゾンの転移頻度の算出についての実験結果の解釈も妥当である。

第3章では、特殊な光合成色素であるクロロフィル $d$ を利用して光合成を行うシアノバクテリア、*Acaryochloris marina*でのトランスポゾンタギング系を確立している。*Synechocystis*で開発した高転移頻度なトランスポゾンタギング系を*A. marina*に適用したことは妥当である。*A. marina*では、モデル生物である*Synechocystis*と

比較して形質転換効率が著しく低いことが知られているからである。また、*A. marina*の順遺伝学的解析に成功したことは、クロロフィル $d$ 合成系の解明への道が見えたという意味で評価に値する。変異体の機能相補実験とその結果の解釈も妥当である。

第4章では、第2章および第3章で得た実験結果に基づき、シアノバクテリアの順遺伝学的解析の展望について論述し、本論文で示した結果より、開発したトランスポゾンタギング系の潜在力について議論している。解析が進んでいると思われる *Synechocystis*においても、順遺伝学的手法を適用することで、さらなる研究の余地があることを明瞭に示した議論は、今後のシアノバクテリア研究の新たな方向性を切り拓いており高く評価できる。

モデル生物を対象とする多くの研究者は、分子遺伝学的研究を行うときに既存の実験系を適用するが、実験系の整備されていない生物を対象とする場合には、自ら系を開発しなければならず、それには困難がともなう。しかし、本論文で有用なトランスポゾンタギング系の開発に成功したことは、非モデル生物の研究の進展を考えると非常に大きな意義がある。

本論文で開発された、転移頻度と汎用性の高いトランスポゾンタギング系は、シアノバクテリアのみならず多くのバクテリアに対しても、有用であると期待されるため、バクテリアの分子遺伝学的研究に大きな影響を与えるであろう実験系である。特に、2008年に全ゲノム配列が解読されたものの分子遺伝学的研究がなされていなかった *A. marina* に関しては、研究を加速するブレイクスルーと言ふべき成果である。本研究によって *A. marina* に対する順遺伝学的解析のための実験系が確立したと考えられる。今後、当該領域の研究が着実に進展すると期待される。

本論文の第2章の内容は既に国際学術誌に掲載されており、第3章の内容も国際学術誌への掲載が決定している。

以上の結果を総合すると、本論文は、生物が種々の有機資源を効果的に産出する機能やメカニズムについて探究する相関環境学専攻分子・生命環境論講座の研究にふさわしい内容を備えたものと判断できる。

よって、本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成27年1月23日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日：                      年                      月                      日以降